

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

ILLÓOLAJOK HATÁSA TOXINTERMELŐ FONALASGOMBA FAJOKRA

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

VERES CSILLA

TÉMAVEZETŐK:

DR. KRISCH JUDIT ÉVA

EGYETEMI DOCENS

PROF. DR. CSABA VÁGVÖLGYI

TANSZÉKVEZETŐ EGYETEMI TANÁR



BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

2019

SZEGED

BEVEZETÉS

A föld népességének növekedése és az ebből adódó élelmezési problémák világszerte egyre nagyobb kihívást jelentenek. Az ENSZ Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezetének (FAO) felmérése alapján évente kb. 1000 millió tonna élelmiszer szennyeződik mikotoxin-termelő fonalgombákkal világszerte. Problémát jelent, ha a szennyezett agráripari termék emberi fogyasztásra vagy állati takarmányozásra kerül, hiszen hatalmas az egészségkárosító kockázatuk. A szennyezett, jelzett határértéket meghaladó mikotoxin tartalmú élelmiszert, takarmányt minden esetben meg kell semmisíteni. Ez óriási veszteséget jelent, egyrészt gazdasági szempontból, másrészt azért, mert világviszonylatban mintegy 842 millió ember nem jut elegendő élelmiszerhez.

Az élelmiszerellátás biztonsága (*food security*) egyre fontosabb feladat. Számos agrártermék (pl. gabonafélék, magvak, diófélék, gyümölcsök, zöldségek, fűszerek) érintett a fonalgombák és az általuk termelt mikotoxinok okozta szennyezettség kérdésében.

Számos biológiai, fizikai, kémiai hatásmechanizmuson alapuló módszert próbáltak már ki a mikotoxinok eltávolítására (pl. gamma-sugárzás, ózonkezelés, hőkezelés, savas-, lúgos kezelés, mikrobák és enzimek alkalmazása), de hatékonysági, gazdaságossági, technológiai szempontból ezek ma még nem jelentenek kielégítő megoldást. Döntő szerepe továbbra is a megelőzésnek van.

Napjainkban olyan anyagokra és módszerekre van szükség, amelyek megakadályozzák a fonalgombák szaporodását és toxintermelését. Az új eljárásokkal szemben az az elvárás, hogy legyenek hatékonyak, gazdaságosak, gyorsan és könnyen alkalmazhatóak, továbbá ne jelentsenek környezeti és egészségügyi kockázatot.

A növényi eredetű illóolajok a szintetikus szerek jövőbeni alternatívái lehetnek, mivel antimikrobiális és antioxidáns hatásuk bizonyított és elismert.

Kísérleteink során ötféle illóolajat (boróka-, citrom-, fahéj-, majoránna-, muskotályzsálya-olaj) teszteltünk ismert és gyakran előforduló *Aspergillus*, *Fusarium* és *Cochliobolus* fajok növekedésének gátlására. Megvizsgáltuk, hogy hogyan hatnak az illóolajok az *Aspergillus parasiticus* és az *Aspergillus nomius* fajok aflatoxin termelésére. Mivel napjainkban a mezőgazdasági termékek aflatoxin szennyezettsége kiemelt figyelmet kap, így a növekedés- és a toxintermelődés vizsgálatait búza szubsztráton is elvégeztük laboratóriumi körülmények között.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Illóolajok fonalagomba fajok növekedésére gyakorolt hatásának vizsgálata: telepnövekedés gátlása, antifungális hatás.
2. Illóolajok okozta morfológiai változások detektálása mikroszkópos- és vizuális vizsgálatokkal.
3. Illóolajok hatásának vizsgálata az *A. parasiticus* és az *A. nomius* aflatoxin termelésére szilárd és folyékony tápközegben.
4. Illóolajok hatásának vizsgálata búza szubsztráton inkubált *A. parasiticus* toxintermelésére vonatkozóan.

ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Alkalmazott mikroorganizmusok: *C. hawaiiensis*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *A. nomius*, *A. westerdijkiae*, *A. longivesica*, *A. parasiticus* var. *globosus*, *A. albertensis*, *F. verticillioides*, *A. awamori*

Felhasznált illóolajok: borókaolaj, citromolaj, fahéjolaj, majoránnaolaj, muskotályzsályaolaj

Alkalmazott természetes szubsztrát: búza (GK 17.13.)

Illóolajok antifungális hatásának vizsgálata

- Illóolajok hatásának vizsgálata a fonalagombák növekedési paramétereire, fordított Petri-csésze módszer alkalmazásával
- MIC értékek meghatározása „agar hígítás” módszerrel

Illóolajok hatása az *Aspergillus*-ok aflatoxin termelésére

- szilárd táptalajon nevelt *A. parasiticus* tenyészetek aflatoxin termelésének mérése
- *A. nomius* és *A. parasiticus* aflatoxin termelés kinetikájának vizsgálata tápoldatban
- *A. parasiticus* aflatoxin termelésének vizsgálata búza szubsztráton

Az illóolajok hatása a fonalagombák morfológiai változásaira

- Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek
- Fénymikroszkópos vizsgálatok
- Vizuális vizsgálatok

EREDMÉNYEK

1) A tesztelt illóolajok a különböző fonalaszombafajok növekedésére, koncentrációtól függően különböző hatást gyakoroltak.

Az öt tesztelt illóolaj közül a fonalaszombafajok növekedésének visszaszorításában legkevésbé hatékonyak a főként monoterpénekből álló citrom és a boróka illóolaj bizonyult. A legjobb eredményeket az *Aspergillus* és a *Fusarium* fajok esetében is a fahéj és majoránna illóolajjal érték el. A fahéj-olaj erős antifungális hatása a benne található fahéjaldehidnek tulajdonítható. A táptalajban történő, igen kis koncentrációjú (0,30-0,65 mg/cm³) alkalmazása teljes növekedésgátlást okozott valamennyi vizsgált *Fusarium* izolátum esetén. A légtérben alkalmazott majoránna és muskotályzsálya illóolajok, különösen a nagyobb koncentrációkban (0,42 mg/cm³), hatékonyak bizonyultak a fonalaszombafajok növekedésgátlásában.

2) Az illóolajok morfológiai változás okoztak a fonalaszombafajoknál, szilárd és folyékony közegben történő tenyésztés során is.

Az illóolajos kezelés hatására a *F. culmorum* hifái elvékonyodtak, a sejtfal károsodott, a citoplazma tartalom kiszivárgott és láthatóvá vált. Valamennyi illóolaj légtérben történő alkalmazása a spórák színének megváltozását eredményezte. A legtöbb illóolaj esetében, az *A. nomius* és az *A. parasiticus* törzsekénél a légtér növekvő illóolaj koncentrációja csökkent spóráképződést eredményezett. A táplevesben tenyésztett *A. nomius* és *A. parasiticus* esetében a fahéj illóolaj alkalmazása a hifák megnyúlását eredményezte.

3) Az illóolajok különböző tenyésztési körülmények között különbözőképpen hatottak az *A. parasiticus* és az *A. nomius* aflatoxin termelésére.

A szilárd táptalajon tenyésztett *A. parasiticus* esetében a majoránna illóolaj mutatta a leghatékonyabb gátlást, mind a növekedés, mind a toxintermelés vonatkozásában. A növekedés és a spóráképzés csaknem teljesen leállt, és az aflatoxin termelés is szignifikánsan csökkent. Szilárd táptalajon tenyésztett fonalaszombafajoknál a toxintermelés akkor kezdett csökkenni, amikor a növekedésgátlás elért egy bizonyos mértéket.

Az *Aspergillus*-ok folyadéktenyésztésében az aflatoxinok mennyisége és a micéliumok száraztömege kezdetben növekedést, majd egy maximum után csökkenést mutatott. Az *A. nomius* esetén az összes, a légtérben alacsony koncentrációban jelenlévő illóolaj serkentőleg

hatott az aflatoxin termelésre. Hatékony gátlást a legnagyobb koncentrációban (0,42 mg/cm³) alkalmazott illóolajokkal tudtunk elérni.

Az *A. parasiticus* folyadéktenyészetben jóval nagyobb mennyiségben termelt aflatoxint, mint az *A. nomius*. Bár a növekedési kísérletekben legkevésbé hatékonyak a citrom és a boróka illóolaj mutatkozott, a folyadéktenyészetekben képesek voltak az aflatoxin termelést csökkenteni. A fahéj-, majoránna és muskotályzsálya illóolajok kisebb koncentrációban inkább serkentőleg hatottak az *A. parasiticus* aflatoxin termelésére.

A mintákban az AFG1 toxin jelent meg a legnagyobb mennyiségben. A legtöbb esetben az inkubációs idő, illetve az illóolaj koncentráció függvényében módosult a mintákban lévő aflatoxinok százalékos aránya. A fahéj, majoránna, muskotályzsálya illóolajok nagyobb, míg a citrom és a boróka illóolajok kisebb mértékű változást okoztak.

4) A búza szubsztráton tenyésztett *A. parasiticus* toxintermelésének gátlásában egyedül a fahéj illóolaj volt hatékony.

A légtérbe vitt fahéjolaj koncentrációjának növelésével az aflatoxin termelés egyre inkább visszaszorult. A citrom és a muskotályzsálya illóolaj nem gátolta szignifikánsan az aflatoxin termelést. Majoránna illóolaj használatakor toxintermelést serkentő hatást észleltünk. A megfelelő inkubációs körülmények ellenére minden mintában kevesebb aflatoxint mértünk az inkubáció végén, mint a közepén, ami a toxinok természetes bomlása miatt következett be.

A búzán legnagyobb mennyiségben és arányban (63-73%) az AFG1, majd az AFB1 (19-38%) termelődött. Az inkubációs idő növekedésével az arányok változása volt jellemző.

Összehasonlítva a kontrollt, valamint a különböző koncentrációjú illóolajjal kezelt mintákat az inkubáció végére mind a kontroll, mind pedig a kezelt mintákban az AFG1 aránya csökkent, az AFB1, AFG2, AFB2 aránya pedig növekedett. Az egyes aflatoxin komponensek arányait tekintve a legkisebb mértékű változást a citrom- és a muskotályzsálya-olajjal történő kezelésnél tapasztaltuk.

ÖSSZEFOGLALÁS

- 1) Az illóolajok hatékonysága a különböző módszereknél eltérő volt. Az *A. parasiticus* esetében, folyadéktenyészetben leghatékonyabbnak a citrom és a boróka illóolaj; a búza szubsztráton a fahéjolaj, míg szilárd táptalajon a majoránna illóolaj tudta a leghatékonyabban visszaszorítani az aflatoxin termelést.
- 2) Az illóolajok antifungális hatása esetében koncentrációfüggést is kimutattunk.
- 3) A kapott eredmények arra mutatnak rá, hogy az illóolajok stresszfaktorként lehetnek jelen, így növelhetik a fonalagombák aflatoxin termelését, különösen alacsony koncentrációban.
- 4) Eredményeink rámutattak arra, hogy illóolajok hatással vannak a fonalagombák szexuális életciklusára, annak beindulására, fenntartására. Kísérleteinkben az illóolajok hatására a konidiogenezis háttérbe szorult, a konídiumok száma csökkent, ugyanakkor a fonalak fokozott növekedése volt megfigyelhető.
- 5) Eredményeink alapján, az illóolajok alkalmazásakor, a módszer függvényében, jól kell megválasztani a koncentrációt, hogy a kívánt hatást elérjük.
- 6) Kísérleti eredményeink szerint, az aflatoxin termelés követte a fonalagomba növekedését, pusztulását. Gátolt aflatoxin termelés csak gátolt fonalagombanövekedéssel volt elérhető.
- 7) Cáfolva más szerzők állítását, az illóolajokat kellően nagy koncentrációban kell alkalmaznunk, hogy az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó gombák növekedésére gyakorolt hatással együtt az aflatoxin termelésre is szignifikánsan csökkentő hatást gyakoroljanak.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Doktori eljárás alapját képező publikációk:

Gömöri, Cs., Vidács, A., Kerekes, E.B., Nacsa-Farkas, E., Böszörményi, A., Vágvölgyi Cs., Krisch, J. (2018) Altered Antimicrobial and Anti-biofilm Forming Effect of Thyme Essential Oil due to Changes in Composition. *Nat. Prod. Commun.* 13(4):483-487.

Impakt faktor: 0,554

Gömöri, Cs., Nacsa-Farkas, E., Kerekes, E.B., Vidács, A., Bencsik, O., Kocsubé, S., Khaled, J.M., Alharbi, N.S., Vágvölgyi, Cs., Krisch, J. (2018) Effect of essential oil vapours on Aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*. *World Mycotoxin J.* 11(4):579-588.

Impakt faktor: 2,406

Kerekes, E.B., Vidács, A., Török Jenei, J., **Gömöri, Cs.,** Petkovits, T., Chandrasekaran, M., Kadaikunnan, S., Alharbi, N.S., Vágvölgyi, Cs., Krisch, J. (2016) Anti-listerial effect of selected essential oils and thymol. *Acta Biologica Hungarica* 67:(3) pp. 333-343.

Impakt faktor: 0,506

Doktori értekezés témájához kapcsolódó szakmai anyagok:

Gömöri, Cs., Nacsa-Farkas, E., Kerekes, E.B., Kocsubé, S., Vágvölgyi, Cs., Krisch, J. (2013) Evaluation of five essential oils for the control of food-spoilage and mycotoxin producing fungi. *Acta Biol. Szeged.* 57(2):113-116.

Gömöri, Cs., Nacsa-Farkas, E., Kerekes, E.B., Vágvölgyi, Cs., Krisch, J. (2015) Reduction of growth and mycotoxin production of food-spoilage and mycotoxin producing fungi using essential oils. In: (Department of Public Health Faculty of Medicine University of Szeged) (szerk.) 17th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Program and Abstracts. p. 48

Gömöri, Cs., Kerekes, E.B., Nacsa-Farkas, E., Vágvölgyi, Cs., Krisch, J. (2015) Mikotoxin termelő gombák fejlődésének és toxin termelésének csökkentése természetes hatóanyagokkal.

In: Gelencsér Éva, Horváth Zoltánné (szerk.) Aktualitások a táplálkozástudományi kutatásokban című V. PhD Konferencia összefoglalói. p. 34.

Gömöri, Cs., Kerekes, E.B., Nacsa-Farkas, E., Vágvölgyi, Cs., Krisch, J. (2014) Mikotoxin termelő gombák fejlődésének és toxin termelésének csökkentése természetes hatóanyagokkal. magyar nyelv előadás, A Magyar Tudomány Ünnepe, Szeged, Messze látó tudomány: felelős kérdések és válaszok a jövőnek, MTA Szegedi Akadémiai Bizottság Székháza (6720 Szeged, Somogyi u. 7.)

Gömöri, Cs., Nacsa-Farkas, E., Kerekes, E.B., Vidács, A., Barna, Zs., Róka, E., Mészáros Basics, B., Póda, T., Vágvölgyi, Cs., Krisch, J. (2017) Presence of Legionella in water samples from community and industrial facilities. In: (Department of Public Health Faculty of Medicine University of Szeged) 19th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Program and abstracts Szeged, Magyarország, University of Szeged Faculty of Medicine, p. 41.

Gömöri, Cs., Nacsa-Farkas, E., Kerekes, E.B., Bencsik, O., Vágvölgyi, Cs., Krisch, J. (2016) Effect of cinnamon essential oil against aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*. In: Gábor Keszthelyi-Szabó, Cecília Hodúr, Judit Krisch (szerk.) International Conference on Science and Technique Based on Applied and Fundamental Research (ICoSTAF'16): Book of Abstracts. p. 24.

Gömöri, Cs., Nacsa-Farkas, E., Kerekes, E.B., Vidács, A., Bencsik, O., Vágvölgyi, Cs., Krisch, J. (2016) Effect of cinnamon essential oil against aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*. In: International Conference on Science and Technique Based on Applied and Fundamental Research (ICoSTAF'16): Proceedings. p. 5

Gömöri, Cs., Nacsa-Farkas, E., Kerekes, E.B., Vágvölgyi, Cs., Krisch, J. (2015) Evaluation of cinnamon and marjoram essential oils for the control of mycotoxigenic *Fusarium* species. In: 6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015). Paper FEMS-3058.

Gömöri, Cs., Nacsa-Farkas, E., Kerekes, E.B., Kocsubé, S., Vágvölgyi, Cs., Krisch, J. (2014) Evaluation of five essential oils for the control of food-spoilage and mycotoxin producing

fungi. In: Gábor Keszthelyi-Szabó, Cecilia Hodúr, Judit Krisch (szerk.) ICoSTAF'14: International Conference on Science and Technique Based on Applied and Fundamental Research. p. 24.

Gömöri, Cs., Nacsa-Farkas, E., Kerekes, E.B., Vidács, A., Barna, Zs., Róka, E., Mészáros Basics, B., Vágvolgyi, Cs., Krisch, J. (2017) Water risk assesment - Legionella control in Hungary - results and experiences in our days. In: (Department of Public Health Faculty of Medicine University of Szeged) (szerk.) 19th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Program and abstracts. p. 18.

Egyéb publikációk:

Kerekes, E.B., Vidács, A., **Gömöri, Cs.**, Takó, M., Vágvolgyi, Cs., Krisch, J. (2016) Essential oils as new alternatives for food preservation. In: Mrša V, Teparić R, Kifer D (szerk.) Power of Microbes in Industry and Environment 2016: Programme and abstracts. p. 44.

Kerekes, E.B., Vidács, A., **Gömöri, Cs.**, Nacsa-Farkas, E., Takó, M., Vágvolgyi, Cs., Krisch, J. (2017) YS-01 Essential oils as food preservatives: from lab experiments to use in real foods. *48th International symposium on Essential Oils*, Pécs, Hungary. Natural Volatiles and Essential Oils. 4:3 p.51.

Kerekes, E.B., **Gömöri, Cs.**, Nacsa-Farkas, E., Vágvolgyi Cs., Krisch, J. (2014) Antifungal activity of selected essential oils on food-spoilage *Aspergillus* species. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése és EU FP7 PROMISE Regional Meeting: Absztraktfüzet*. p. 29.

Kerekes, E.B., Vidács A., Török Jenei, J., **Gömöri, Cs.**, Takó, M., Chandrasekaran, M., Kadaikunnan, S., Alharbi, N.S., Krisch, J., Vágvolgyi, Cs. (2015) Essential oils against bacterial biofilm formation and quorum sensing of food-borne pathogens and spoilage microorganisms. In: Méndez-Vilas A (szerk.) *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*. Badajoz: Formatex Research Center pp. 429-437. 9 p (Microbiology Book Series; 5.) Volume 1.

Kerekes, E.B., **Gömöri, Cs.**, Vidács, A., Nacsa-Farkas, E., Böszörményi, A., Zouabi, N.M., Vágvölgyi, Cs., Krisch, J. (2018) Marjoram essential oil: changes in composition and effectiveness against bacterial biofilms. In: Tamás, László; Zelenyánszki, Helga (szerk.) Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája “FIBOK 2018” Abstract Book, Szeged, Magyarország, JATEPress Kiadó, p. 96.

Berta, M., Molnár, I., Zentai, Á., Kecskeméti, A., Kerekes, E.B., Nacsa-Farkas, E., **Gömöri, Cs.**, Vidács, A., Kocsubé, S., Bencsik, O. (2018) Preservation effect of cinnamon and clove essential oil vapors on shelled walnut. *Acta Biologica Szegediensis* 62: 2 pp. 141-145., 5 p.

Összesített impakt faktor: 3,466